



中华人民共和国海洋行业标准

HY/T 0319—2021

贝类 脂溶性海洋生物毒素的检测 液相色谱-串联质谱法

Shellfish—Determination of lipophilic marine biotoxins—
LC-MS/MS method

2021-07-02 发布

2021-11-01 实施

中华人民共和国自然资源部 发布

目 次

前言 I

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 原理 1

4 试剂和材料 1

5 仪器设备 2

6 样品 3

7 试验步骤 3

8 结果计算与表述 5

9 精密度 6

10 其他..... 6

附录 A（资料性） 脂溶性海洋生物毒素 7

附录 B（资料性） 特征离子质量色谱图 8

附录 C（规范性） 脂溶性海洋生物毒素的毒性因子 10

参考文献 11

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中华人民共和国自然资源部提出。

本文件由全国海洋标准化技术委员会(SAC/TC 283)归口。

本文件起草单位：国家海洋环境监测中心、中国科学院海洋研究所、厦门大学、中国水产科学研究院黄海研究所。

本文件主要起草人：许道艳、梁玉波、刘仁沿、刘磊、陈猛、于仁诚、谭志军、高春蕾、续彦龙。

贝类 脂溶性海洋生物毒素的检测 液相色谱-串联质谱法

警示——为避免毒素的危害,应戴手套进行操作。移液管及移液器吸头等用过的器材、废弃的提取液等应在次氯酸钠溶液(5%)浸泡 1 h 以上以使毒素分解。

1 范围

本文件规定了贝类脂溶性海洋生物毒素大田软海绵酸、鳍藻毒素、蛤毒素、虾夷扇贝毒素、原多甲藻毒素、环亚胺毒素等 11 个毒素化合物的液相色谱-串联质谱检测方法原理、操作步骤及结果计算等。

本文件适用于贝类体中脂溶性海洋生物毒素的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

3 原理

贝类样品经甲醇提取,碱性条件下水解释放酯化态生物毒素部分,用 HLB 固相萃取柱净化,液相色谱分离,串联质谱测定,外标曲线法定量。

4 试剂和材料

4.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

4.2 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

4.3 甲酸(HCOOH)。

4.4 甲酸铵(HCOONH_4)。

4.5 氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$):浓度 $\geq 25\%$ 。

4.6 氢氧化钠(NaOH)。

4.7 盐酸(HCL):浓度 $\geq 36\%$ 。

4.8 氢氧化钠溶液(2.5 mol/L):准确称取 50 g 氢氧化钠,用水定容至 500 mL,室温保存。

4.9 盐酸溶液(2.5 mol/L):准确量取 104.5 mL 盐酸,用水定容至 500 mL,室温保存。

4.10 甲醇溶液(30%):量取 30 mL 甲醇加到 70 mL 水中,混合均匀,室温,现用现配。

4.11 甲醇溶液(20%):量取 20 mL 甲醇加到 80 mL 水中,混合均匀,室温,现用现配。

4.12 氨水甲醇溶液(0.3%):吸取 0.3 mL 氨水,用甲醇定容至 100 mL,室温,现用现配。

4.13 脂溶性海洋生物毒素标准(见附录 A)溶液:OA、DTX1、DTX2、PTX2、YTX、homoYTX、AZA1、AZA2、AZA3、GYM、SPX1 标准物质纯度 $\geq 97\%$,避光保存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 。

4.14 脂溶性海洋生物毒素标准储备液:分别吸取适量的各脂溶性海洋生物毒素标准溶液(见 4.13),甲醇(见 4.2)配制储备溶液。0.22 μm 滤膜(见 5.12)过滤, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用。各脂溶性海洋生物毒素标准储备液浓度分别为:OA 40 ng/mL, DTX1 40 ng/mL, DTX2 40 ng/mL, YTX 400 ng/mL, homoYTX 400 ng/mL, PTX2 1 000 ng/mL, SPX1 200 ng/mL, GYM 10 ng/mL, AZA1 200 ng/mL, AZA2 100 ng/mL, AZA3 100 ng/mL。

4.15 脂溶性海洋生物毒素混合标准工作溶液:分别吸取适量的各脂溶海洋生物毒素标准储备溶液(见 4.13),甲醇(见 4.2)配制正离子混合标准工作溶液(PTX2、AZA1、AZA2、AZA3、GYM、SPX1)和负离子混合标准工作溶液(OA、DTX1、DTX2、YTX、homoYTX)。0.22 μm 滤膜(见 5.12)过滤, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用。各脂溶性海洋生物毒素的浓度见表 1。

注:除非另有说明,以上所用试剂均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

表 1 脂溶性海洋生物毒素标准工作溶液

浓度单位为纳克每毫升

组别	毒素简称	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5
正离子	PTX2	500	250	125	62.5	31.25
	AZA1	100	50	25	12.5	6.26
	AZA2	50	25	12.5	6.25	3.125
	AZA3	50	25	12.5	6.25	3.125
	GYM	5	2.5	1.25	0.625	0.312 5
	SPX1	100	50	25	12.5	6.26
负离子	OA	20	10	5	2.5	1.25
	DTX1	20	10	5	2.5	1.25
	DTX2	20	10	5	2.5	1.25
	YTX	200	100	50	25	12.5
	homoYTX	200	100	50	25	12.5

5 仪器设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

5.2 分析天平:感量 0.000 01 g。

5.3 天平:感量 0.01 g。

5.4 匀质机。

5.5 涡漩振荡器。

5.6 离心机。

5.7 水浴锅。

5.8 固相萃取装置。

5.9 真空泵。

5.10 pH 计。

5.11 固相萃取柱:基质为含有 N-乙烯吡咯烷酮聚合物的吸附剂,填料质量为 30 mg,体积为 1 mL,或者相当。

5.12 0.22 μm 滤膜。

6 样品

用清水将贝类外表清洗干净。切开闭壳肌打开贝壳,用蒸馏水淋洗贝类内部以清除泥沙和其他杂物,取出贝肉置于孔径约 2 mm 的金属筛网上沥水 5 min。为保证样品的均匀性,至少取 100 g 贝肉用匀质机匀浆 30 min,充分混匀。

7 试验步骤

7.1 提取

称取 2.00 g 贝类组织匀浆于具塞离心管中。加入 9.0 mL 甲醇(见 4.2),用涡旋振荡器混匀 1 min,3 000 rpm 离心 10 min,上清液转移至 20 mL 的容量瓶中,沉渣再加入 9 mL 甲醇(见 4.2)重复提取一次,合并两次提取液,用甲醇(见 4.2)定容至 20 mL,将溶液分成两份,备用。

7.2 水解

为了检测酯化态的 OA 组毒素含量。取 1.0 mL(7.1 中的一份)放入色谱进样瓶中,加入 125 μ L 氢氧化钠溶液(见 4.7),用涡旋振荡器混匀 0.5 min,置于 76 $^{\circ}$ C 水浴 40 min,冷却至室温,加入 125 μ L 盐酸溶液(见 4.8)中和,涡旋混匀 0.5 min,0.22 μ m 滤膜过滤后备用。

7.3 净化

固相萃取柱依次用 1.0 mL 甲醇活化、1.0 mL 30% 甲醇平衡。取 1.0 mL 提取液(7.1 中的另一份)加 2.8 mL 水混匀后转入预处理的固相萃取柱,以约每秒一滴的流速通过固相萃取柱,用 1.0 mL 20% 甲醇溶液淋洗,再以 1.0 mL 氨水甲醇溶液洗脱,收集洗脱液,摇匀后,0.22 μ m 滤膜过滤,液相色谱-串联质谱测定。按照 7.3 步骤净化水解液(见 7.2)。

7.4 样品测定

7.4.1 正离子模式液相色谱参考条件

正离子模式测定 PTX2、AZA1、AZA2、AZA3、GYM、SPX1,液相色谱参考条件如下。

- 色谱柱:C18,50 mm \times 2.1 mm,填料粒径 2.5 μ m,或相当者。
- 流动相:A:2 mmol/L 甲酸铵和 50 mmol/L 甲酸的水溶液;B:2 mmol/L 甲酸铵和 50 mmol/L 甲酸的 95% 乙腈水溶液。
- 流速:0.3 mL/min。
- 柱温:25 $^{\circ}$ C。
- 进样量:10 μ L。
- 流动相梯度:0 min \sim 4 min,10% B 线性变化至 80% B;4 min \sim 6 min,保持 80% B,6 min \sim 6.5 min 线性变化至 10% B,平衡 2.5 min。

7.4.2 负离子模式液相色谱参考条件

负离子模式测定 OA、DTX1、DTX2 和 YTX、homoYTX,液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱:C18,150 mm \times 3.0 mm,填料粒径 3.5 μ m,或相当者。
- 流动相:A:0.05% 的氨水溶液(pH 11);B:含有 0.05% 氨水的乙腈-水(90/10,体积比)溶液(pH 11)。
- 流速:0.4 mL/min。
- 柱温:40 $^{\circ}$ C。
- 进样量:10 μ L。

- f) 流动相梯度:1 min~10 min,10% B 线性变化至 90% B;10 min~13min,保持 90% B,13 min~15 min 线性变化至 10% B,平衡 4 min。

7.4.3 质谱条件

质谱条件如下:

- a) 离子源:电喷雾离子源。
- b) 扫描模式:正离子和负离子模式。
- c) 检测方式:多反应监测。
- d) 喷雾电压:4 500 V。
- e) 毛细管温度:450 ℃(正离子模式);600 ℃(负离子模式)。
- f) 源内碰撞解离电压:5 V。
- g) 雾化气流速:60 L/min。
- h) 辅助加热气流速:50 L/min。
- i) 离子碎片参数见表 2。

表 2 离子对、锥孔电压和碰撞电压

目标毒素	母离子 m/z	子离子 m/z	锥孔电压 V	碰撞电压 V
OA	803.5	563.2	-80	-60
		255.1		
DTX1	817.5	577.2	-80	-60
		255.2		
DTX2	803.5	577.2	-80	-60
		255.2		
homoYTX	1 155.5	1 075.5	-12	-45
		869.5		
YTX	1 141.5	1 061.7	-12	-48
		855.5		
PTX-2	876.5	823.5	90	39
		213.2		
AZA-1	842.5	824.6	110	46
		806.6		
AZA-2	856.5	838.5	110	46
		820.5		
AZA-3	828.5	810.5	110	46
		792.3		
GYM	508.3	490.3	95	35
		392.3		
SPX1	692.4	444.2	90	40
		164.1		

7.4.4 标准曲线制作

毒素标准系列工作液(见 4.13)分别注入液相色谱-串联质谱仪中,测定相应各毒素的峰面积,以标准工作液的质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

7.4.5 试样溶液测定

将试样溶液注入液相色谱-串联质谱仪中,得到峰面积,根据基质标准曲线得到试样溶液中各毒素的质量浓度。在上述检测条件下,试样溶液中各毒素的保留时间与标准溶液中毒素的保留时间之间的偏差应在±2.5%之内。试样溶液与标准工作液中毒素的定性离子的相对丰度一致,其丰度比偏差应符合表 3 要求。各毒素的特征离子质量色谱图见附录 B。

表 3 定性测定相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%~50%	>10%~20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.5 空白试验

除不加试样外,按(7.1、7.2、7.3)步骤得到空白溶液,测定方法同(7.4)。

8 结果计算与表述

8.1 结果计算

样品中各脂溶性海洋生物毒素的含量按公式(1)计算。

$$X_i = \frac{(c_i - c_0) \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X_i —— 试样中脂溶性海洋生物毒素的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
 - c_i —— 从标准工作曲线中得到的试样中脂溶性海洋生物毒素溶液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
 - c_0 —— 从标准工作曲线中得到的空白试验中脂溶性海洋生物毒素溶液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
 - V —— 样品溶液最终定容体积,单位为毫升(mL);
 - m —— 最终样品溶液所代表试样质量,单位为克(g)。
- 以重复性条件下平行测定结果的算术平均值表示,保留三位有效数。

8.2 总毒力计算

脂溶性海洋生物毒素的毒性因子列于附录 C。样品中脂溶性海洋生物毒素的含量则按照毒性因子,统一转换为 W_{neq} 来表示,计算公式(2):

$$W_{\text{neq}} = \sum_{i=1}^n X_i \cdot r_i \dots\dots\dots (2)$$

- W_{neq} —— 表示各毒素(OAs、PTXs、AZAs、YTXs)的总毒力;
- X_i —— 表示相对应的脂溶性海洋生物毒素的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- r_i —— 毒性因子。

9 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。本方法的批内相对标准偏差≤15%，实验室间相对标准偏差≤37%。

10 其他

本方法各毒素的定量限于表 4 中。本方法在 0.08 μg/kg~200 μg/kg 添加浓度水平上的回收率为 80%~120%。

表 4 脂溶性海洋生物毒素定量限

目标毒素	定量限 μg/kg
OA	6.60
DTX1	9.90
DTX2	13.20
PTX2	79.20
YTX	85.80
homoYTX	6.60
AZA1	2.31
AZA2	3.30
AZA3	1.65
GYM	0.33
SPX1	3.30

附 录 A
(资料性)
脂溶性海洋生物毒素

脂溶性海洋生物毒素标准名称及相关信息见表 A.1。

表 A.1 脂溶性海洋生物毒素标准名称及相关信息

毒素简称	中文名称	英文名称	分子式	分子质量	CAS No.
OA	大田软海绵酸	Okadaic acid	$C_{44}H_{68}O_{13}$	805.00	78111-17-8
DTX1	鳍藻毒素-1	Dinophysistoxin-1	$C_{45}H_{70}O_{13}$	819.03	81720-10-7
DTX2	鳍藻毒素-2	Dinophysistoxin-2	$C_{44}H_{68}O_{13}$	805.00	139933-46-3
PTX-2	扇贝毒素-2	Pectenotoxin-2	$C_{47}H_{70}O_{14}$	859.07	97564-91-5
YTX	虾夷扇贝毒素	Yessotoxin	$C_{55}H_{82}O_{21}S_2$	1 143.4	112514-54-2
homoYTX	类虾夷扇贝毒素	homoyessotoxin	$C_{56}H_{84}O_{21}S_2$	1 157.38	196309-94-1
AZA-1	原多甲藻酸-1	Azaspiracid-1	$C_{47}H_{71}NO_{12}$	842.1	214899-21-5
AZA-2	原多甲藻酸-2	Azaspiracid-2	$C_{48}H_{73}NO_{12}$	856.1	265996-92-7
AZA-3	原多甲藻酸-3	Azaspiracid-3	$C_{46}H_{69}NO_{12}$	828.04	265996-93-8
GYM	环亚胺毒素	Gymnodimine	$C_{32}H_{45}NO_4$	507.71	173792-58-0
SPX1	13-去甲螺旋内酯 C	13-Desmethyl-spirolide C	$C_{42}H_{61}NO_7$	691.9	334974-07-1

附录 B
(资料性)
特征离子质量色谱图

负离子和正离子模式下脂溶性海洋生物毒素特征离子色谱图如图 B.1 和图 B.2 所示。

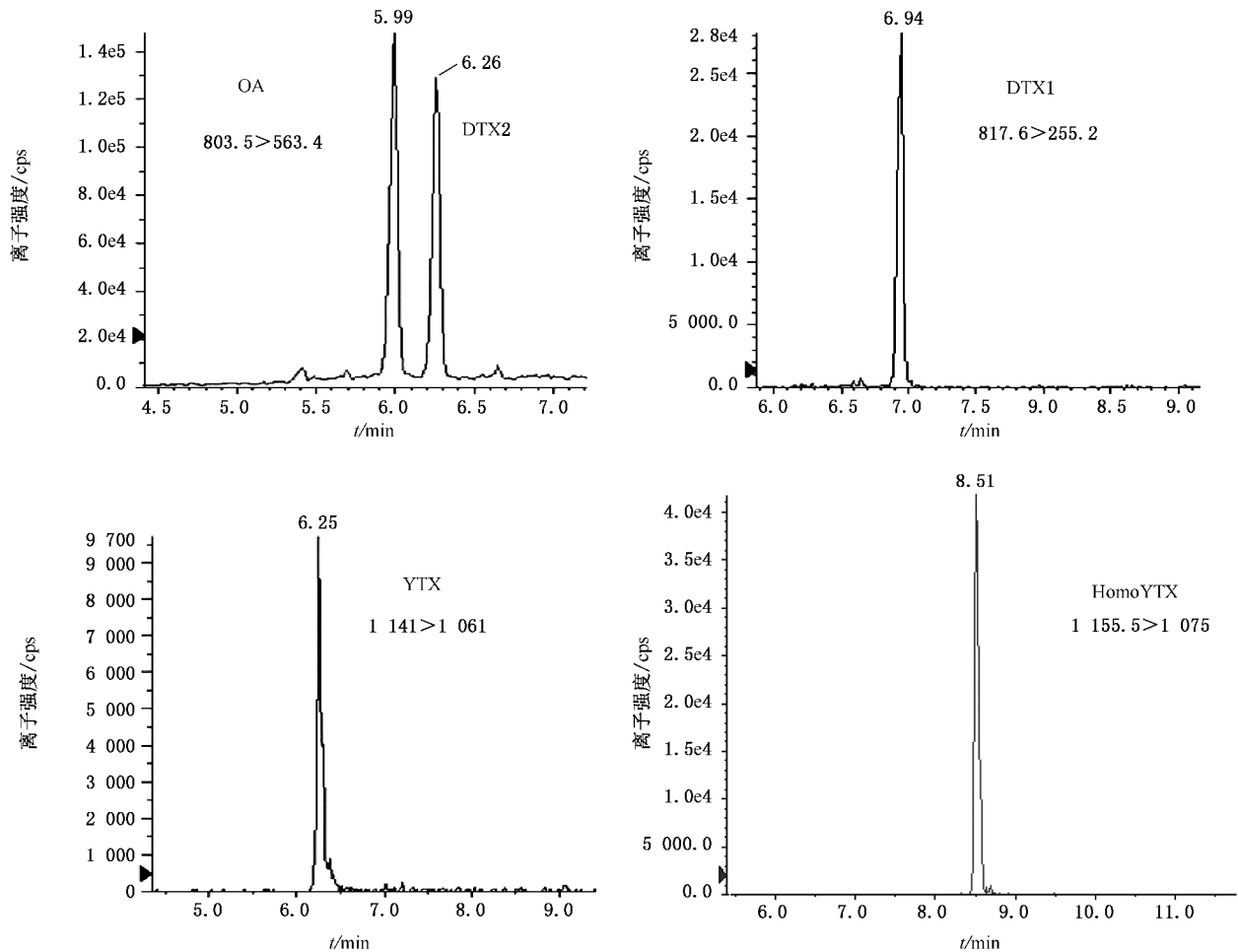


图 B.1 负离子模式下脂溶性海洋生物毒素混合标准品溶液特征离子质量色谱图

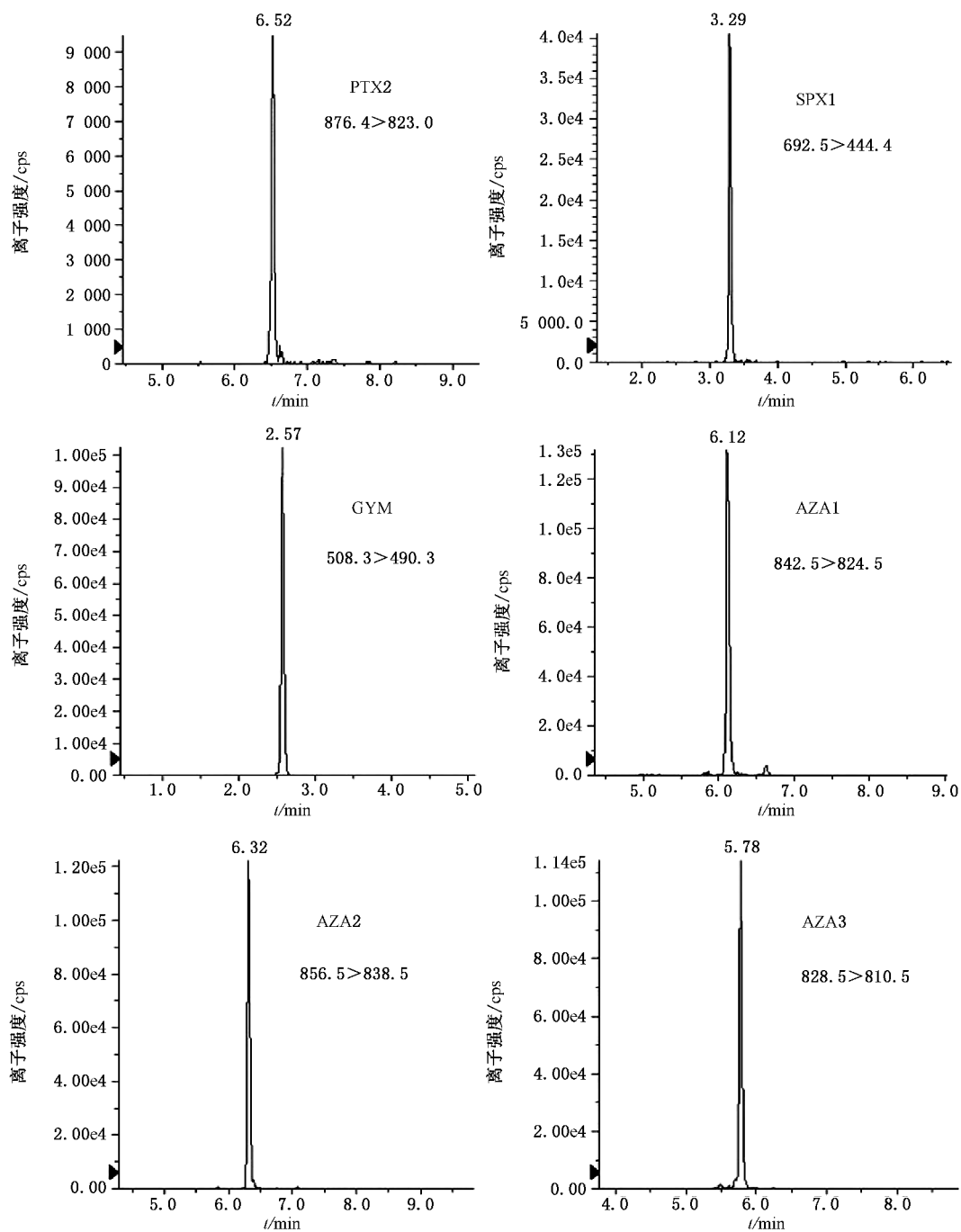


图 B.2 正离子模式下脂溶性海洋生物毒素混合标准品溶液特征离子质量色谱图

附录 C

(规范性)

脂溶性海洋生物毒素的毒性因子

脂溶性海洋生物毒素的毒性因子见表 C.1。

表 C.1 脂溶性海洋生物毒素的毒性因子

目标毒素	类似物	毒性因子(r)	结果表述
OA 组	OA	1	μg OA 当量/kg
	DTX1	1	
	DTX2	0.6	
PTX 组	PTX2	1	μg PTX 当量/kg
AZA 组	AZA1	1	μg AZA 当量/kg
	AZA2	1.8	
	AZA3	1.4	
YTX 组	YTX	1	μg YTX 当量/kg
	homoYTX	1	

参 考 文 献

- [1] GB 5009.212 食品安全国家标准 贝类中腹泻性贝类毒素的测定
 - [2] 海洋生物毒素欧盟参考实验室标准 软体动物体中脂溶性海洋生物毒素液相串联质谱法的测定(European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins EU-Harmonised standard operating procedure for determination of lipophilic marine biotoxins in mollusks by LC-MS/MS, Version 5, January 2015)
-

中 华 人 民 共 和 国 海 洋
行 业 标 准
贝 类 脂 溶 性 海 洋 生 物 毒 素 的 检 测
液 相 色 谱 - 串 联 质 谱 法

HY/T 0319—2021

*

中 国 标 准 出 版 社 出 版 发 行
北 京 市 朝 阳 区 和 平 里 西 街 甲 2 号 (100029)
北 京 市 西 城 区 三 里 河 北 街 16 号 (100045)

网 址 : www.spc.org.cn

服 务 热 线 : 400-168-0010

2021 年 11 月 第 一 版

*

书 号 : 155066 • 2-36216

版 权 专 有 侵 权 必 究



HY/T 0319-2021



码上扫一扫 正版服务到